

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

54 2578

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
12 août 2004 (12.08.2004)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
**WO 2004/066969 A2**

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> : **A61K 7/06**, 7/48, 35/80

(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR2004/000167

(22) Date de dépôt international :  
23 janvier 2004 (23.01.2004)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :  
03/00818 24 janvier 2003 (24.01.2003) FR

(71) Déposant (*pour tous les États désignés sauf US*) : LANATECH Laboratoire Nature et Technique [FR/FR]; 19, rue Auber, F-75009 Paris (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*) : JANAIL-HAC, Marie-Claire [FR/FR]; 19, rue Auber, F-75009 Paris (FR). RENARD, Catherine [FR/FR]; 19, rue Auber, F-75009 Paris (FR).

(74) Mandataire : DE SAINT PALAIS, Arnaud; Cabinet Moutard, 35, rue de la Paroisse, F-78000 Versailles (FR).

(81) États désignés (*sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible*) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (*sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible*) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Déclaration en vertu de la règle 4.17 :

- relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv)) pour US seulement

Publiée :

- sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport

*En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.*

WO 2004/066969 A2

(54) Title: COMPOSITION COMPRISING AN EXTRACT OF APHANIZOMENON FLOS-AQUAE, USE THEREOF AND PREPARATION OF SAME

(54) Titre : COMPOSITION COMPRENANT UN EXTRAIT D'APHANIZOMENON FLOS-AQUAE, SON UTILISATION ET SA PRÉPARATION

(57) Abstract: The invention relates to a topical composition comprising at least one extract of *Aphanizomenon flos-aquae flos-aquae* at a concentration of between 0.01 and 10 % dry matter in relation to the total weight of the composition. The inventive composition is used to treat the upper layers of the epidermis and/or the hair.

(57) Abrégé : La composition applicable par voie topique selon l'invention comporte au moins un extrait d'*Aphanizomenon-flos-aquae flos-aquae* à une concentration comprise entre 0,01 et 10% en matière sèche du poids total de la composition. Elle s'applique au traitement des couches supérieures de l'épiderme et/ou du cheveu.

**Composition comprenant un extrait d'aphanizomenon flos-aquae, son  
5 utilisation et sa préparation**

10 La présente invention concerne une composition comprenant un extrait d'algue *Aphanizomenon-flos-aquae flos-aquae* applicable par voie topique. Elle s'applique plus particulièrement, mais non exclusivement, au traitement des couches supérieures de l'épiderme et/ou du cheveu, notamment à la prévention et au traitement du vieillissement cutané induit et/ou à la 15 réparation de certaines altérations des tissus cutanés telles que les vergetures et/ou à la contribution à l'embellissement du cheveu.

De façon générale, le vieillissement cutané induit est provoqué par des facteurs extrinsèques (vieillissement photo-induit et environnemental). Au 20 niveau de la peau, l'exposition environnementale quelle soit solaire ou quelle soit due aux polluants atmosphériques se traduit par des ridules et rides profondes, des télangiectasies et des lésions purpuriques, des tâches pigmentaires et hyperplasie sébacée, des troubles de l'hydratation cutanée, une augmentation de la perte transépidermique en eau, une modification des 25 lipides de surface, une augmentation de la desquamation cutanée.

Les plus importantes modifications histologiques liées au vieillissement induit siègent au niveau du derme, notamment des fibroblastes, des composants de la matrice extracellulaire et du réseau vasculaire. La jonction dermo-30 épidermique s'affaisse, entraînant une diminution des points d'attache entre le derme et l'épiderme. Une altération simultanée des cellules de l'épiderme est également notée avec une perte de polarité des kératinocytes, une diminution du nombre de cellules de Langherans etc....

La présente invention concerne l'utilisation d'une variété unique de cyanobactéries, variété découverte dans le lac Klamath, Oregon (USA) et caractérisée par Renhui et al. (Renhui Li, Wayne W. Carmichael, Yongding Liu & Makoto M. Watanabe, Hydrobiology, 438: 99-105, 2000, Taxonomic re-evaluation of *Aphanizomenon-flos-aquae* NH-5 based on morphology and 16S rRNA gene sequences).

Les cyanobactéries constituent un groupe particulier de procaryotes autrefois rattaché au règne végétal. Ce sont des êtres vivants unicellulaires très petits souvent bleu-vert (d'où le nom d'algues bleues) autotrophes et d'une organisation relativement simple. Elles ont l'aptitude de croître dans des milieux extrêmes et de fixer le diazote.

Des préparations à base d'*Aphanizomenon-flos-aquae flos-aquae* séchées sont préconisées en tant que complément alimentaire pour leurs nombreux constituants, notamment leur forte teneur en protéines hautement assimilables et la présence des vitamines B6, B12 et F.

En effet, les études répertoriées montrent que l'administration orale d'*Aphanizomenon-flos-aquae flos-aquae* :

- permet d'augmenter la réactivité du système immunitaire par augmentation de la synthèse d'ARN messager codant pour l'Interleukine 1 (IL-1) (Characterization of human monocyte activation by a water soluble preparation of *Aphanizomenon flos-aquae*, Phytomedicine, Pugh N, Pasco DS, 2001, Nov 8(6) : 445-53),
- est bénéfique pour la santé grâce à la diversité des nutriments qui la compose (Microalgae as food & supplement, Kay RA, Crit. Rev. Food Sci. Nut., 1991, 30(6) : 555-73),
- est une bonne source nutritionnelle en acides gras polyinsaturés qui lui confèrent une propriété hypocholestérolémiantre (Rafail I. Kushak, Christian Drapeau, Elisabeth M.Van Cott, Harland H; Winter, JANA, Vol.2 (3), 2000, 59-65).

En revanche, aucun document ne fait référence à l'utilisation de l'*Aphanizomenon-flos-aquae flos-aquae* pour la préparation de compositions

bénéfiques pour la prévention du vieillissement cutané et l'embellissement des cheveux notamment en vue d'une application topique.

Or, une incorporation *per se* d'*Aphanizomenon-flos-aquae flos-aquae* dans 5 des compositions utilisables par voie topique n'est pas possible compte tenu du faible degré de solubilisation de l'algue séchée, de sa forte coloration, de sa forte odeur et du manque de stabilité de ses composés biochimiques.

L'invention a donc pour objet de résoudre ces inconvénients par la mise au 10 point d'une composition applicable par voie topique, qui permet de conserver les principes actifs de l'*Aphanizomenon-flos-aquae flos-aquae* dans toute leur intégrité afin de participer activement au traitement des couches supérieures de l'épiderme et/ou du cheveu notamment à la prévention du vieillissement cutané et à l'embellissement du cheveu.

15

A cet effet, elle propose une composition applicable par voie topique comportant au moins un extrait d'*Aphanizomenon-flos-aquae flos-aquae* à une concentration comprise entre 0,01 et 10% en matière sèche du poids total de la composition.

20

Avantageusement, un procédé pour la préparation de ladite composition comportant au moins un extrait d'*Aphanizomenon-flos-aquae flos-aquae* comprend la préparation dudit extrait par extraction des substances actives contenues dans l'*Aphanizomenon-flos-aquae flos-aquae* par exemple sèche 25 lyophilisée notamment selon les étapes suivantes :

- au moins une macération à une température de 25 à 50°C d'algues bleues séchées de l'espèce *Aphanizomenon-flos-aquae flos-aquae* en présence d'enzymes telles que des cellulases, des pectinases et des glucanases pendant un temps de dix minutes à dix heures sous agitation,
- une séparation liquide/solide par centrifugation,
- une séparation liquide/liquide par un procédé de filtration membranaire,

- un séchage et/ou une dilution dans une solution contenant des adjuvants spécifiques, par exemple du sorbitol,
- une éventuelle séparation spécifique des divers constituants ainsi extraits, par exemple par chromatographie; les différentes substances obtenues pouvant être utilisées seules ou en mélange, selon l'effet recherché.

L'étape de séchage pourra aussi bien être un séchage classique (chaleur) qu'un séchage par nébulisation ou lyophilisation.

10

Par ce procédé, les substances ayant une activité majeure sur la peau et le cheveu sont extraites, à savoir :

- des caroténoïdes,
- des phycocyanines,
- des acides aminés, notamment la méthionine, la lysine, la proline et la sérine,
- des polysaccharides.

Le susdit extrait pourra être dissous dans une solution aqueuse telle qu'un mélange eau/sorbitol.

Ladite composition pourra se présenter sous la forme d'émulsions simples ou multiples telles qu'une émulsion eau/huile ou huile/eau ou encore une émulsion triphasique et/ou un gel ou une solution aqueuse ou hydroalcoolique.

Ladite composition pourra également se présenter sous la forme d'un système vectorisé à libération contrôlée ou à libération modulée.

30 Des modes d'exécution de l'invention et des exemples de formulations dudit cosmétique et/ou composition dermatologique seront décrits, ci-après, à titre d'exemples non limitatifs.

La figure unique est la représentation d'un schéma d'un profil obtenu par hybridation de sondes d'ADN complémentaires marquées avec les différents ARNm obtenus avec un épiderme normal humain traité avec un extrait brut aqueux d'*Aphanizomenon-flos-aquae flos-aquae*.

5

Le procédé pour la préparation d'une composition comportant au moins un extrait d'*Aphanizomenon-flos-aquae flos-aquae* contenant des substances actives comprend la préparation dudit extrait selon les étapes suivantes :

- 10 - Au moins une macération à une température de 25 à 50°C et de préférence de 35°C d'algues bleues séchées *Aphanizomenon-flos-aquae flos-aquae* en présence de cellulases, de pectinases et de glucanases pendant un temps de dix minutes à dix heures et de préférence de quatre heures sous agitation. Les résultats des essais montrent que l'attaque des différentes enzymes permet une meilleure solubilisation de la paroi parenchymateuse des algues et ainsi une plus grande richesse en polysaccharides de l'extrait aqueux ainsi préparé.
- 15 - Une séparation liquide/solide par centrifugation sous une accélération de 5 000 à 10 000g, et de préférence de 9000g.
- 20 - Une séparation liquide/liquide par un procédé de filtration membranaire avec un seuil de coupure compris entre 100 000 daltons et 0,2 µm.
- 25 - Un séchage et/ou une dilution dans une solution aqueuse de sorbitol. On entend par séchage aussi bien un séchage classique (chaleur) qu'un séchage par nébulisation ou lyophilisation.
- 30 - Une séparation spécifique des divers constituants ainsi extraits par chromatographie, les différentes substances obtenues étant utilisées seules ou en mélange, selon l'effet recherché.
- L'extrait ainsi obtenu est composé notamment de protéines (entre 0,05 à 1% m/m (rapport massique)), de vitamine B12 (entre 0,003 à 0,05% m/m), de Lysine (entre 0,2 à 3% m/m), de méthionine (entre 0,04 à 0,6% m/m), de proline (entre 0,15 à 2,5% m/m) et de sérine (entre 0,15 à 2,5% m/m).

- La méthode des filtres à haute densité ou "cDNA macroarrays" sur un support comprenant au moins 600 gènes caractéristiques du système cutané et du système pileux a été utilisée pour étudier l'effet de l'extrait 5 *d'Aphanizomenon-flos-aquae flos-aquae* sur l'expression des gènes codant pour des protéines majeures d'intérêt cosmétique ou dermo-cosmétique.
- Dans cette méthode, les dépôts (sondes) sont des clones d'ADNc (acide désoxyribonucléique complémentaire) ou des produits de PCR (« Polymerase Chain Reaction » ou réaction en chaîne de la polymérase), 10 fixés à haute densité, sur une membrane de nylon. Le marquage est le plus souvent radioactif et le criblage est réalisé en excès de cible, on obtient ainsi une mesure de l'abondance relative de chacun des ARNm (acide ribonucléique messager) présents dans l'échantillon de départ.
- 15 Les protéines sont obtenues à partir d'explants de peau préparés suite à une plastie mammaire sur un donneur.  
Deux échantillons de peau de 20 cm<sup>2</sup> ont été préparés et maintenus en survie dans un milieu de culture.  
L'extrait *d'Aphanizomenon-flos-aquae flos-aquae* a été appliqué sur l'explant 20 à raison de 5 mg/cm<sup>2</sup> d'une solution à 2% d'extrait brut aqueux sans adjuvant le matin et le soir pendant deux jours.  
Après chaque application, les explants ont été incubés à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub>.  
L'explant de peau témoin a été traité selon le même procédé avec de l'eau 25 stérile.  
Les morceaux de peau (épidermes) ont été rincés puis ils ont été placés en présence de Tri-reagent ® (Sigma T9424) puis congelés à -80°C.
- Les ARN ont été extraits et purifiés à partir des surnageants obtenus après 30 broyage des épidermes congelés.  
Les ARN sont traités, d'une part, au moyen d'une enzyme ARNase-out afin d'inhiber les enzymes ARNases et, d'autre part, au moyen d'une enzyme ADNase 1 pour éliminer les traces d'ADN contaminant l'ARN.

La qualité des ARN est contrôlée par électrophorèse sur gel d'agarose.

Les groupes d'ARNm sont purifiés par hybridation des extrémités poly(A) (chaîne de nucléotides adénosines) des ARNm avec des amorces oligo(dT)  
5 (oligonucléotides constitués de desoxythymidines) biotinyées.

Des sondes ADN multiples marquées au phosphore  $^{33}\text{P}$  ont été réalisées par transcription inverse des ARNm liés sur des billes de poly(dT) (chaîne de nucléotides desoxythymidines), à l'aide d'un groupe d'amorces spécifiques  
10 10 des séquences immobilisées sur les filtres en présence de  $\alpha^{33}\text{P}$  dATP ( $\alpha^{33}\text{P}$ -desoxyadénosine triphosphate).

Les sondes marquées ont été purifiées par chromatographie d'exclusion encore appelée tamisage moléculaire, gel-filtration ou perméation de gel.

15

La qualité et l'équivalence des sondes marquées ont été évaluées par comptage en scintillation liquide. Les scintillateurs sont des milieux dans lesquels une fraction non négligeable de l'énergie absorbée lors d'une interaction avec une particule  $\alpha$  ou  $\beta$  est transformée, par luminescence, en  
20 photons susceptibles d'être détectés. Cette détection consiste à les convertir en un signal électrique qui peut être traité par une électronique appropriée.

Des membranes de type "Custom ATLAS BA 600/1" sont prétraitées puis les ADNc immobilisés sur chaque membrane sont hybridés (68°C, 12 heures)  
25 avec des sondes marquées correspondantes, les filtres sont ensuite lavés et analysés par quantification directe de la radioactivité des spots à l'aide d'un appareil du type phosphorImager™ (Cyclone, Packard Instrument) et de son logiciel QuantArray™ (Packard).

30 Le tableau I ci-dessous présente les gènes dont l'expression relative (RE) a été significativement modifiée après quarante huit heures d'une application bi-quotidienne d'un extrait brut d'Aphanizomenon-flos-aquae flos-aquae sur un épiderme normal humain.

Tableau I :

	Témoin	Extrait d' <i>Aphanizomenon-</i> <i>flos-aquae flos-</i> <i>aquae</i>	
Nom des gènes	RE	RE	%
Vimentine (VIM)	10,0	21,8	217
Métalloprotéase 11 (MMP11); Stromélysine 3	6,2	15,9	255
Métalloprotéase 3 (MMP3); Stromélysine 1 (STMY1; SL1); Transine 1	5,7	17,3	306
Inhibiteur tissulaire de métalloprotéase 1 (TIMP1); Potentiateur de l'activité érythroïde (EPA); Inhibiteur des collagénases fibroblastiques	10,0	24,3	244
Sous-unité gamma du récepteur de l'interleukine-2 (IL-2R gamma; IL2RG); Récepteur commun des chaînes gamma des cytokines ; P64	6,6	20,0	302
Filaggrine épidermale (FLG)	28,7	7,3	25
Loricrine (LOR; LRN)	31,9	11,7	37
Protéine liée à la différenciation des adipocytes	15,8	23,1	146
Intégrine bêta 4 (ITGB4); antigène CD104	24,7	40,1	162
Protéine liant le calcium S100 A7; Psoriasine	135,2	202,0	149
Protéine liant le calcium S100 A8 (S100A8); Calgranuline A (CALA); "migration inhibitory factor-related protein 8" (MRP8); "leukocyte L1 complex light chain; cystic fibrosis antigen" (CFAG)	311,1	485,4	156
S100 Protéine liant le calcium A9 (S100A9); Calgranuline B (CAGB); "migration inhibitory factor-related protein 14" (MRP14); "leukocyte L1 complex heavy chain";	210,2	323,8	154
Ornithine décarboxylase (ODC)	9,4	18,1	193
Spermidine acétyltransférase	13,9	26,3	189
elafin; Inhibiteur spécifique des élastases (ESI); « skin-derived antileukoproteinase » (SKALP)	22,6	34,3	152
« calmodulin-like skin protein » (CLSP)	31,8	16,0	50

Le schéma de la figure unique représente le profil obtenu par hybridation des sondes d'ADN complémentaires marquées avec les différents ARNm

obtenus avec un épiderme normal humain traité avec un extrait brut aqueux d'*Aphanizomenon-flos-aquae flos-aquae*.

- L'expression des gènes indiqués en gras dans le schéma de la figure unique
- 5 (calgranuline A, calgranuline B, loricrine, psoriasine, protéine du type calmoduline, MMP3 et TIMP1) a été également quantifiée par la technique de RT-PCR (« Polymerase Chain Reaction Reverse Transcriptase » ou Transcription inverse - Réaction en chaîne de la polymérase) afin de valider les résultats premièrement obtenus.
- 10 Dans cette expérience, l'actine a été utilisée comme marqueur de référence.

Les résultats présentés dans le tableau II ci-dessous ont été obtenus :

Gène	Expression du gène par rapport au témoin (base 100) – RT-PCR
Calgranuline A	153
Calgranuline B	166
Filaggrine	16
Loricrine	14
Psoriasine	137
"Calmodulin Like Skin Protein"	44
Matrice Métalloprotéase 3	230
Inhibiteur tissulaire de la Métalloprotéase 1	209

- Le traitement des explants de peau par un extrait d'*Aphanizomenon-flos-aquae flos-aquae* induit des modifications significatives dans l'expression de la différenciation et prolifération des cellules de l'épiderme. Ces modifications sont identiques à celles obtenues avec un composé de type rétinol (ou rétinoïde : lipide diffusant directement dans la membrane plasmique) sans que l'extrait d'*Aphanizomenon-flos-aquae flos-aquae* n'en présente les
- 15 contraintes de formulation.
- 20

L'expression de la CLSP (« Calmodulin Like Skin Protein » ou protéine de peau du type Calmoduline), un marqueur spécifique de la différenciation des kératinocytes, est considérablement réprimée par des rétinoïdes et leurs

25 analogues dans la stratum granulosum (la troisième couche la plus interne

de l'épiderme où la kératine apparaît sous forme de granules) et les couches inférieures du stratum corneum (couche la plus externe de l'épiderme) (Mehül B. et al., Calmodulin-like skin protein: a new marker of keratinocyte differentiation, J. Invest. Dermatol., 2001 Jun, 116(6), 905-9).

5

L'extrait brut d'*Aphanizomenon-flos-aquae flos-aquae* réduit par deux fois l'expression de la CLSP, ceci est un argument en faveur de son implication dans la modulation de ce marqueur.

- 10 Par ailleurs, les rétinoïdes inhibent l'expression de la loricrine (Brown L.J. et al., Retinoic acid suppression of loricrin expression in reconstituted human skin cultured at the liquid-air interface, J. Invest. Dermatol., 1994 Jun, 102(6), 886-90), tout comme l'extrait brut d'*Aphanizomenon-flos-aquae flos-aquae* qui en réduit de plus de 10 fois l'expression.

15

- Quant aux filaggrines, qui résultent en outre de la digestion des protéines de profilaggrines contenues dans les granules dans la partie inférieure du stratum corneum, elles sont ensuite digérées par des peptidases en acides aminés. L'inhibition des messagers des filaggrines pourrait résulter d'une inhibition globale de la différenciation des kératinocytes et ainsi contribuer à une meilleure cohésion des cornéocytes (dans la couche cornée, le kératinocyte prend le nom de cornéocyte) et donc à une amélioration de la fonction barrière cutanée.

- 20  
25 La loricrine est le constituant majeur de la paroi des cornéocytes, et est contenue dans les granules jusqu'au stade terminal de la différenciation et contribue ensuite à la formation de l'enveloppe des cornéocytes afin de la renforcer. La diminution de son expression sous l'effet de l'extrait brut d'*Aphanizomenon-flos-aquae flos-aquae* est en cohérence avec l'évolution  
30 des expressions des filaggrines et de la CLSP.

En revanche, l'expression des calgranulines A et B, qui sont synthétisées par les cellules épithéliales et les kératinocytes, est augmentée sous l'effet de l'extrait brut d'*Aphanizomenon-flos-aquae flos-aquae*. La psoriasine qui,

- comme la calgranuline A et la calgranuline B, appartient à la famille des protéines S100, et dont l'expression est inducible par les rétinoïdes (Tavakkov A. et al., A retinoic acid-inducible skin-specific gene (RIS-1/psoriasin): molecular cloning and analysis of gene expression in human skin in vivo and cultured skin cells in vitro, Mol. Biol. Rep., 1994, 20(2), 75-83) dans les kératinocytes primaires en différenciation a une expression qui augmente également sous l'effet du traitement. Il en est de même de l'augmentation de l'expression de la MMP3 qui est connue pour être significativement augmentée sous l'effet des rétinoïdes (Varani J. et al., Expression of serine proteases and metalloproteinases in organ-cultured human skin. Altered levels in the presence of retinoic acid and possible relationship to retinoid-induced loss of epidermal cohesion, Am. J. Pathol., 1994, 145, 561-573).
- 15 Tous ces événements - activation de l'expression relative des messagers calgranuline A, calgranuline B, psoriasine, métalloprotéase 3 et inhibition de l'expression des messagers filaggrine, loricrine, "calmodulin like skin protein" - laissent entrevoir une action analogue à celle des rétinoïdes (« rétinoïd' like ») de l'application topique de l'extrait brut d'*Aphanizomenon-flos-aquae flos-aquae*. De plus, l'augmentation de l'expression de l'Inhibiteur Tissulaire de la Métalloprotéase 1 (TIMP1) suppose un effet anti-âge lors de l'application topique d'une composition cosmétique à base d'*Aphanizomenon-flos-aquae flos-aquae*.
- 20 25 Une composition pour le soin après soleil comprend :
- |       |   |            |
|-------|---|------------|
| A1*   | Eau déminéralisée                                     | qsp** 100% |
| A2    | Sequestrene ® NA4/Celon ® E/Trilon ® B                | 0,01%      |
| B1    | Nipagin ® M/POB Méthyle                               | 0,05 %     |
| C1    | Carbopol ® 940  | 15,00%     |
| 30 D1 | Triéthanolamine                                       | 0,5 à 1%   |
| E1    | Conservateur antimicrobien                            | 0,5 à 1%   |
| F1    | Silicone  | 1 à 2%     |
| F2    | Parfum  | 0,15%      |
| G1    | Extrait d' <i>Aphanizomenon-flos-aquae flos-aquae</i> | 0,5 à 5%   |

En solution dans du sorbitol et de l'eau (soit de 1 à 5%  
d'extrait sec d'*Aphanizomenon-flos-aquae flos-aquae*)

(\* : chacune des lettres placées devant un composant représente une phase)

5 (\*\* qsp : quantité suffisante pour)

Une composition pour les soins anti-âge comprend :

	A1	Emulium ® (Gattefossé)	4,0%
	A2	Amerchol ® (Amerchol)	6,0%
10	A3	Amerlate ® (Amerchol)	2,0%
	A4	Végétol ® huileux calendula (Gattefossé)	2,0%
	A5	LNST ® 98 (Lanatech)	1,0%
	B1	Eau déminéralisée	qsp100%
	B2	Carbopol ® (BF Goodrich)	10,0%
15	C	Abil ® (Goldschmidt)	6,0%
	D1	Eau déminéralisée	5,0%
	D2	Triéthanolamine (Prolabo)	0,2%
	E1	Conservateur antimicrobien	0,5%
	E2	Glycérine naturelle (Elf Atochem)	4,0%
20	F	Fluidamid ® DF 125 (Roquette)	4,0%
	G	Extrait d' <i>Aphanizomenon-flos-aquae flos-aquae</i>	0,5 à 5%
		En solution dans du sorbitol et de l'eau (soit de 1 à 5% d'extrait sec d' <i>Aphanizomenon-flos-aquae flos-aquae</i> )	
25	H	Parfum	0,3%

Une composition pour le lavage et le soin des cheveux comprend :

	A1	Texapon ® (Henkel)	10,00%
	B1	Eau déminéralisée	qsp100%
	B2	Sequestrene ® (Prolabo)	0,05%
30	C1	Tegobétaïn ® (Goldschmidt)	10,00%
	D1	Empilan ® (Albright & Wilson St Mihiel)	4,00%
	E1	Hydralphatine ® 3P (Lanatech)	3,00%
	E2	Conservateur antimicrobien	0,50%
	F1	Glutamate (Amerchol)	15,00%

G1	Oramix ® (Seppic)	6,00%
G2	Simulsol ® (Seppic)	1,00%
H1	Eau déminéralisée	5,00%
H2	Acrysol ® (Seppic)	6,00%
5	J1 Extrait d' <i>Aphanizomenon-flos-aquae flos-aquae</i> En solution dans du sorbitol et de l'eau (soit de 1 à 5% d'extrait sec d' <i>Aphanizomenon-flos-aquae flos-aquae</i> )	0,5 à 5%

Une composition soin anti-rides comprend :

10	A1 Eau déminéralisée	qsp 100%
	A2 Sepigel ® (Seppic)	1,0%
	B1 Emulium ® (Gattefossé)	3,0%
	B2 Amerchol ® (Amerchol)	4,0%
	B3 Crodamol ® (Croda)	8,0%
15	B4 Abil ® (Goldschmidt)	5,0%
	C Conservateur antimicrobien	0,3%
	D Fluidamid ® DF15 (Gattefossé)	3,0%
	E Extrait d' <i>Aphanizomenon-flos-aquae flos-aquae</i> En solution dans du sorbitol et de l'eau (soit de 1 à 5% d'extrait sec d' <i>Aphanizomenon-flos-aquae flos-aquae</i> )	0,5 à 5%
20		

Une composition masque traitant pour cheveux desséchés comprend :

A1	Cetaryl glucoside (Montanov ® 68 - SEPPIC)	7 %
A2	Coco bêtaïne (AMONYL ® 265 BA - SEPPIC)	0,5 %
25	A3 Beurre de karité	4 %
	A4 Cire d'abeille	2 %
	A5 Dimethicone (DOW CORNING)	5 %
	B1 Eau déminéralisée	qsp 100%
	B2 Decyl glucoside (ORAMIX ® NS 10 - SEPPIC)	1 %
30	C1 Parfum	0,5%
	C2 Conservateur antimicrobien	0,5%
	C3 Extrait d' <i>Aphanizomenon-flos-aquae flos-aquae</i> En Solution dans du sorbitol et de l'eau (soit de 1 à 5% d'extrait sec d' <i>Aphanizomenon-flos-aquae flos-aquae</i> )	0,5 à 5%

Une crème de nuit comprend :

A1	Cetearyl glucoside (Montanov ® 68 - SEPPIC)	6 %
A2	Huiles végétales	20 %
5 A3	DL-alpha-tocopherol (BASF)	0,05%
B1	Eau déminéralisée	qsp 100%
C1	Conservateur antibactérien	0,5%
C2	Parfum	0,3 %
C4	Extrait d' <i>Aphanizomenon-flos-aquae flos-aquae</i>	0,5 à 5%
10	En Solution dans du sorbitol et de l'eau (soit de 1 à 5% d'extrait sec d' <i>Aphanizomenon-flos-aquae flos-aquae</i> )	

**Revendications**

1. Composition applicable par voie topique,  
caractérisée en ce qu'elle comporte au moins un extrait d'*Aphanizomenon-flos-aquae flos-aquae* à une concentration comprise entre 0,01 et 10% en matière sèche du poids total de la composition.
2. Composition selon la revendication 1,  
caractérisée en ce qu'elle se présente sous la forme d'émulsions simples ou multiples telles qu'une émulsion eau/huile ou huile/eau ou encore une émulsion triphasique et/ou un gel ou une solution aqueuse ou hydroalcoolique.
3. Composition selon la revendication 1,  
15 caractérisée en ce qu'elle se présente sous la forme d'un système vectorisé à libération contrôlée ou à libération modulée.
4. Utilisation d'une composition selon la revendication 1 pour la fabrication de produits pour le traitement des couches supérieures de l'épiderme et/ou du cheveu.
5. Utilisation d'une composition selon l'une des revendications 1 à 4 pour la fabrication d'un cosmétique.
- 25 6. Utilisation d'une composition selon l'une des revendications 1 à 4 pour la fabrication d'une composition dermatologique.
7. Composition pour le soin après soleil,  
caractérisée en ce qu'elle comprend :

30	▪ Eau déminéralisée	qsp* 100%
	▪ Sequestrene ® NA4/Celon ® E/Trilon ® B	0,01%
	▪ Nipagin ® M/POB Méthyle	0,05 %
	▪ Carbopol ® 940	15,00%
	▪ Triéthanolamine	0,5 à 1%

	▪ Conservateur antimicrobien	0,5 à 1%
	▪ Silicone	1 à 2%
	▪ Parfum	0,15%
	▪ Extrait d' <i>Aphanizomenon-flos-aquae flos-aquae</i>	0,5 à 5%
5	En solution dans du sorbitol et de l'eau (soit de 1 à 5% d'extrait sec d' <i>Aphanizomenon-flos-aquae flos-aquae</i> )	

8. Composition pour les soins anti-âge,  
caractérisée en ce qu'elle comprend :

10	▪ Emulium ®	4,0%
	▪ Amerchol ®	6,0%
	▪ Amerlate ®	2,0%
	▪ Végétol ® huileux calendula	2,0%
	▪ LNST ® 98	1,0%
15	▪ Eau déminéralisée	qsp100%
	▪ Carbopol®	10,0%
	▪ Abil ®	6,0%
	▪ Eau déminéralisée	5,0%
	▪ Triéthanolamine	0,2%
20	▪ Conservateur antimicrobien	0,5%
	▪ Glycérine naturelle	4,0%
	▪ Fluidamid ® DF 125	4,0%
	▪ Extrait d' <i>Aphanizomenon-flos-aquae flos-aquae</i>	0,5 à 5%
	En solution dans du sorbitol et de l'eau (soit de 1 à 5% d'extrait sec d' <i>Aphanizomenon-flos-aquae flos-aquae</i> )	
25	▪ Parfum	0,3%

9. Composition pour le lavage et le soin des cheveux,  
caractérisée en ce qu'elle comprend :

30	▪ Texapon ®	10,00%
	▪ Eau déminéralisée	qsp100%
	▪ Sequestrene ®	0,05%
	▪ Tegobétaïn ®	10,00%
	▪ Empilan ®	4,00%

	▪ Hydralphatine 3P	3,00%
	▪ Conservateur antimicrobien	0,50%
	▪ Glutamate	15,00%
	▪ Oramix ®	6,00%
5	▪ Simulsol ®	1,00%
	▪ Eau déminéralisée	5,00%
	▪ Acrysol ®	6,00%
	▪ Extrait d' <i>Aphanizomenon-flos-aquae flos-aquae</i>	0,5 à 5%
10	En solution dans du sorbitol et de l'eau (soit de 1 à 5% d'extrait sec d' <i>Aphanizomenon-flos-aquae flos-aquae</i> )	

10. Composition soin anti-rides,  
caractérisée en ce qu'elle comprend :

	▪ Eau déminéralisée	qsp 100%
15	▪ Sepigel ®	1,0%
	▪ Emulium ®	3,0%
	▪ Amerchol ®	4,0%
	▪ Crodamol ®	8,0%
	▪ Abil ®	5,0%
20	▪ Conservateur antimicrobien	0,3%
	▪ Fluidamid ® DF15	3,0%
	▪ Extrait d' <i>Aphanizomenon-flos-aquae flos-aquae</i>	0,5 à 5%
	En solution dans du sorbitol et de l'eau (soit de 1 à 5% d'extrait sec d' <i>Aphanizomenon-flos-aquae flos-aquae</i> )	

25

11. Composition masque traitant pour cheveux desséchés,  
caractérisée en ce qu'elle comprend :

	▪ Cetaryl glucoside	7 %
	▪ Coco bétaine	0,5 %
30	▪ Beurre de karité	4 %
	▪ Cire d'abeille	2 %
	▪ Dimethicone	5 %
	▪ Eau déminéralisée	qsp 100%
	▪ Decyl glucoside	1 %

	▪ Parfum	0,5%
	▪ Conservateur antimicrobien	0,5%
	▪ Extrait d' <i>Aphanizomenon-flos-aquae. flos-aquae</i>	0,5 à 5%
5	En Solution dans du sorbitol et de l'eau (soit de 1 à 5% d'extrait sec d' <i>Aphanizomenon-flos-aquae flos-aquae</i> )	

## 12. Crème de nuit,

caractérisée en ce qu'elle comprend :

	▪ Cetearyl glucoside	6 %
10	▪ Huiles végétales	20 %
	▪ DL-alpha-tocopherol	0,05%
	▪ Eau déminéralisée	qsp 100%
	▪ Conservateur antibactérien	0,5%
	▪ Parfum	0,3 %
15	▪ Extrait d' <i>Aphanizomenon-flos-aquae flos-aquae</i>	0,5 à 5%
	En Solution dans du sorbitol et de l'eau (soit de 1 à 5% d'extrait sec d' <i>Aphanizomenon-flos-aquae flos-aquae</i> )	

## 13. Procédé pour la préparation d'une composition selon la revendication

20 1,

caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

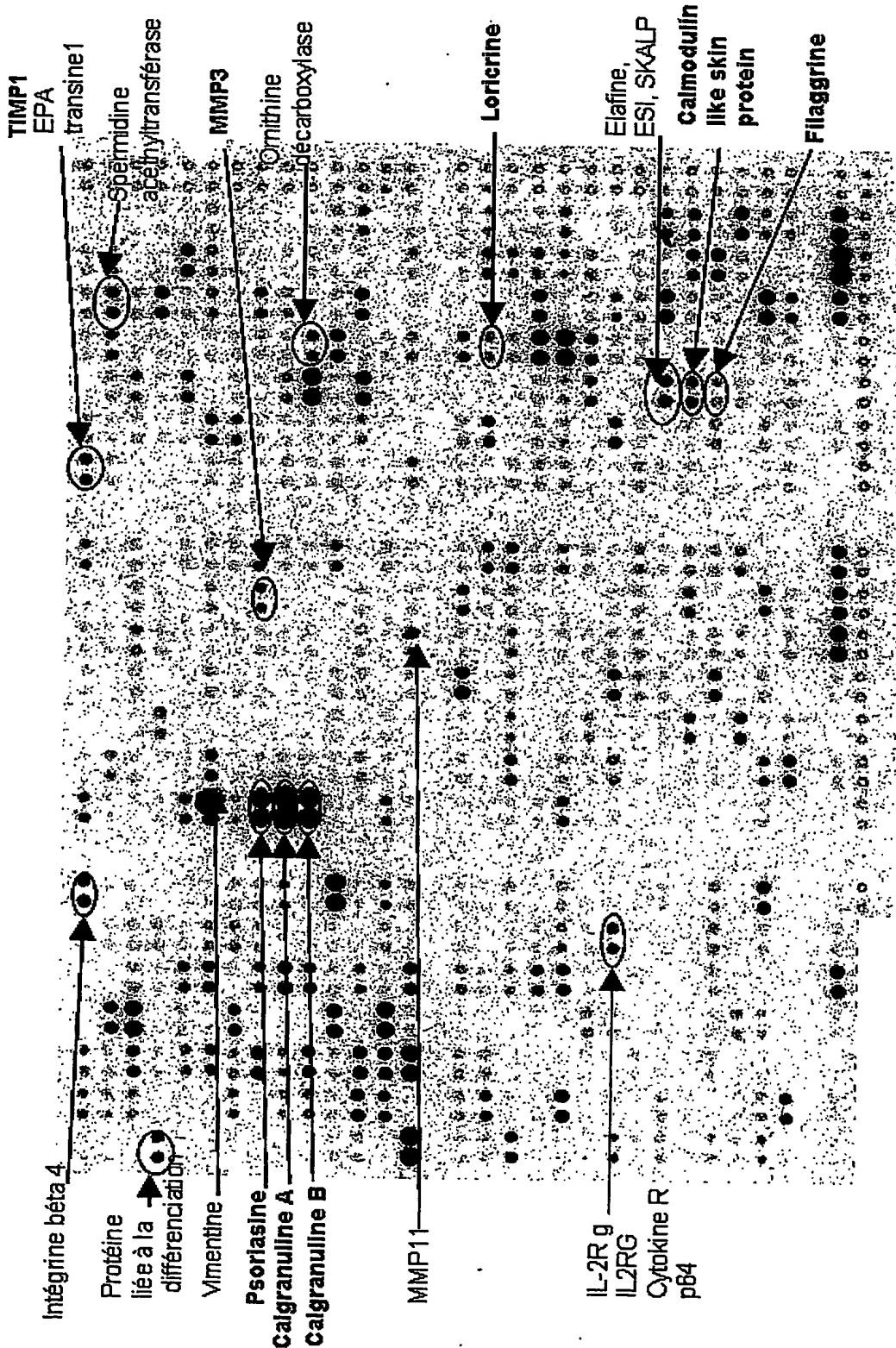
- au moins une macération à une température de 25 à 50°C et, de préférence, 35°C d'algues bleues séchées d'*Aphanizomenon-flos-aquae flos-aquae* en présence d'enzymes telles que des cellulases, des pectinases et des glucanases pendant un temps de dix minutes à dix heures et de préférence quatre heures sous agitation,
- 25 - une séparation liquide/solide par centrifugation,
- une séparation liquide/liquide par un procédé de filtration membranaire,
- 30 - un séchage et/ou une dilution dans une solution contenant des adjuvants spécifiques, par exemple du sorbitol,
- une éventuelle séparation spécifique des divers constituants ainsi extraits, par exemple par chromatographie, les différentes substances obtenues pouvant être utilisées seules ou en mélange.

14. Procédé selon la revendication 13,  
caractérisé en ce que l'étape de séchage est un séchage classique (chaleur)  
ou un séchage par nébulisation ou lyophilisation.

5

15. Procédé selon la revendication 13,  
caractérisé en ce que le susdit extrait est dissous dans une solution aqueuse  
telle qu'un mélange eau/sorbitol.

1/1



(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
12 août 2004 (12.08.2004)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
**WO 2004/066969 A3**

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> :  
**A61K 35/80, 35/74**

CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(21) Numéro de la demande internationale :  
**PCT/FR2004/000167**

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(22) Date de dépôt international :  
23 janvier 2004 (23.01.2004)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :  
03/00818 24 janvier 2003 (24.01.2003) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : LANATECH Laboratoire Nature et Technique [FR/FR]; 19, rue Auber, F-75009 Paris (FR).

(72) Inventeurs; et  
(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : JANAIL-HAC, Marie-Claire [FR/FR]; 19, rue Auber, F-75009 Paris (FR). RENARD, Catherine [FR/FR]; 19, rue Auber, F-75009 Paris (FR).

(74) Mandataire : DE SAINT PALAIS, Arnaud; Cabinet Moutard, 35, rue de la Paroisse, F-78000 Versailles (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO,

Déclaration en vertu de la règle 4.17 :

- relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv)) pour US seulement

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont requises

(88) Date de publication du rapport de recherche internationale: 30 septembre 2004

*En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.*

WO 2004/066969 A3

(54) Title: COMPOSITION COMPRISING AN EXTRACT OF APHANIZOMENON FLOS-AQUAE, USE THEREOF AND PREPARATION OF SAME

(54) Titre : COMPOSITION COMPRENANT UN EXTRAIT D'APHANIZOMENON FLOS-AQUAE, SON UTILISATION ET SA PRÉPARATION

(57) Abstract: The invention relates to a topical composition comprising at least one extract of *Aphanizomenon flos-aquae flos-aquae* at a concentration of between 0.01 and 10 % dry matter in relation to the total weight of the composition. The inventive composition is used to treat the upper layers of the epidermis and/or the hair.

(57) Abrégé : La composition applicable par voie topique selon l'invention comporte au moins un extrait d'*Aphanizomenon-flos-aquae flos-aquae* à une concentration comprise entre 0,01 et 10% en matière sèche du poids total de la composition. Elle s'applique au traitement des couches supérieures de l'épiderme et/ou du cheveu.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR2004/000167

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
IPC 7 A61K35/80 A61K35/74

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE, FSTA, PASCAL, CHEM ABS Data, CAB Data

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 2002, no. 07, 3 July 2002 (2002-07-03) & JP 2002 069443 A (MICROALGAE CORPORATION), 8 March 2002 (2002-03-08) abstract -----	1-15
A	DATABASE BIOSIS 'Online' BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; November 2001 (2001-11), PUGH N ET AL: "Characterization of human monocyte activation by a water soluble preparation of Aphanizomenon flos-aquae." XP002254817 Database accession no. PREV200200205541 abstract -/-	1-15

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 August 2004

Date of mailing of the international search report

23/08/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Menidjel, R

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR2004/000167

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	& PHYTOMEDICINE (JENA), vol. 8, no. 6, November 2001 (2001-11), pages 445-453, ISSN: 0944-7113 -----	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR2004/000167

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
JP 2002069443	A 08-03-2002	NONE	

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Document de Recherche Internationale No  
PCT/FR2004/000167

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 7 A61K35/80 A61K35/74

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE, FSTA, PASCAL, CHEM ABS Data, CAB Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 2002, no. 07, 3 juillet 2002 (2002-07-03) & JP 2002 069443 A (MICROALGAE CORPORATION), 8 mars 2002 (2002-03-08) abrégé -----	1-15
A	DATABASE BIOSIS 'Online' BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; novembre 2001 (2001-11), PUGH N ET AL: "Characterization of human monocyte activation by a water soluble preparation of Aphanizomenon flos-aquae." XP002254817 Database accession no. PREV200200205541 abrégé -/-	1-15

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

### \* Catégories spéciales de documents cités:

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- \*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- \*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- \*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- \*&\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

12 août 2004

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

23/08/2004

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Menidjel, R

**RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE**

Demande Internationale No

PCT/FR2004/000167

**C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS**

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
	& PHYTOMEDICINE (JENA), vol. 8, no. 6, novembre 2001 (2001-11), pages 445-453, ISSN: 0944-7113 -----	

**RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE**

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande Internationale No

PCT/FR2004/000167

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
JP 2002069443	A 08-03-2002	AUCUN	